

해수와 해산물로부터 *Listeria* 속의 분리와 세균학적 조사

강치희 · 이만효 · 황용일*

경남대학교 생명과학부

Bacteriological Study of *Listeria* sp. Isolated from Seawater and Sea Food

Chi-Hee Kang, Man-hyo Lee and Yong-Il Hwang*

Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

Four species of the genus of *Listeria* were isolated from seawater and sea food in Kyungnam province, South Korea. These isolated strains were classified into *Listeria* sp. from different samples by appropriate cultivation conditions and biochemical tests including serological test. In a day enrichment cultivation, the following strains were found out of 100 samples: *L. innocua* (35%), *L. ivanovii* (4%), *L. monocytogenes* (4%), and *L. welshimeri* (1%). For seven days enrichment culture, *L. innocua* (38%), *L. ivanovii* (5%), *L. monocytogenes* (7%), and *L. welshimeri* (1%) were isolated. From these results, *Listeria* species were more efficiently isolated in seven day enrichment broth than in one day enrichment. However, these isolated *Listeria* species were less grown in the selective medium than in the enrichment medium. Isolation rates of *Listeria* species showed differency for each sample and *Listeria* species were more abundantly isolated in shrimps (80%) and crayfishes (80%) than little neck clams (50%), seawater (25%) and mussels (20%). From the results of serological classes for the seven *L. monocytogenes*, two strains were defined as type I and the other five strains as type IV.

Key words – *Listeria*, serological test, metapenaeus shrimp, hard-shelled mussel, little neck clams

서 론

최근 유럽과 북미지역에서 *Listeria monocytogenes*에 의한 유제품, 어패류, 식육제품, 야채류 등의 식품오염으로 listeriosis가 발생하여 새로운 식중독 원인균으로 밝혀지고 있다. *Listeria*는 1926년 Murray 등과 Wilson 등이 거대 단핵구 증가증(large-mononuclear leucocytosis)에 걸린 토끼에서 분리하여 *Bacterium monocytogenes*라고 불렀고[20,34],

1927년 Pirie는 이를 *Listerella hepatolytica*로 제의했다가 1940년, *Listeria monocytogenes*로 명명하였다[21].

현재 *Listeria* 속은 *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*와 *L. seeligeri* 등 7개의 종으로 분류되고 있다[23-26]. 이 중에서 사람과 동물에게 치명적인 병원체로 밝혀지고 있는 종은 *L. monocytogenes*이며[22,32], 이는 intracellular pathogen으로 listeriolysin O (LLO)를 지니고 있으며 이에 의해 cytotoxicity를 나타내며 LLO가 원인으로 hemolysin 활성을 지니고 있기 때문으로 알려져 있다. *L. monocytogenes*와 관련된 listeriosis는 다양한 형태의 증상을 가지며, 사람에 따라 여러가지 차이가 나

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 055-249-2685, Fax : 055-249-2995
E-mail : yihwang@kyungnam.ac.kr

타나지만 일반적으로 임신부, 신생아, 유아와 면역기능이 저하된 성인들에게 유산, 호흡기 압박, 수막염, 패혈증, 두통, 구토, 뇌막염 등을 수반하는 질병을 일으키며, 사망률은 30%에 가깝다[1,5,7].

외국에서 *L. monocytogenes*로 인한 listeriosis 발병사례는 1980년 뉴질랜드에서 조개와 생선 등의 해산물을 섭취한 사람 중에 29명이 listeriosis가 발생해 9명이 사망하는 사건이 있었으며, 이것은 해산물에 의한 listeriosis가 발생한 첫 번째 사례이다[14]. 1986년 이후 우리나라에서 미국으로 수출된 냉동 굴과 가리비, 명란젓 등에서 *L. monocytogenes*가 검출된 보고가 있었고[31,33], 1993년 3월 뉴질랜드에서 생산된 홍합을 섭취하고 외국의 임신부가 유산을 일으킨 사례의 보도로[12] 보건당국은 국내에 수입된 뉴질랜드산 홍합을 긴급 수거하여 *L. monocytogenes*를 분리한 사례도 있었다[10].

이에 본 연구에서는 국내의 해수 및 해산물에 대한 *Listeria* 속의 오염 실태를 조사하기 위하여 남해안의 해수와 시중에서 판매되는 해산물 등에서 *Listeria* 속의 분리를 시도하였으며, 배양시간과 배지에 따른 분리율과 생화학적 특성 및 분리된 *L. monocytogenes*에 대하여 혈청형 시험을 실시하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

검체

실험에 사용된 검체는 경상남도 창원 지역의 시장에서 유통되는 새우(20건), 가재(20건), 바지락(20건), 홍합(20건) 등의 해산물 80건과 사천, 통영, 거제, 하동 지역 해변에서 멸균병으로 채수한 해수(20건)를 검체로 사용하였다.

표준 균주

양성 대조 구로 사용한 표준균주는 *L. monocytogenes* ATCC 19111이며, CAMP test 지표균주는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Rodococcus equi* KCTC 9082를 사용하였다.

배지 및 시약

해수와 해산물에서의 *Listeria* 속의 분리는 Difco Lab. 사 제품의 *Listeria* Enrichment Broth (이하 LEB), LiCl-Phenylethanol-Moxalactam Agar (이하 LPM), Tryptic Soy Agar (Broth)+0.6% Yeast Extract (이하 0.6% TSA-YE, TSB-YE),

Triple Sugar Iron Agar (이하 TSI), Gram 염색시약 (Gram stain set)과 Unipath Ltd. 제품의 *Listeria* Selective Agar base (이하 Oxford)를 사용하였다. 1차 생화학시험 배지는 Purple Broth (1% D-Xylose와 1% L-Rhamnose, 0.5% Salicin과 1% α -Methyl-D-mannoside를 따로 멸균 후 첨가)배지와 혼합하여 사용하였다. β -Hemolysis 시험을 하기 위해 제품화된 5% Sheep Blood Agar 평판배지(이하 5% BAP, 아산제약)를 사용하였으며, 2차 생화학시험을 하기 위하여 bioMérieux sa 제품의 API 20E와 Rapid ID 32 STREP, API LISTERIA Kit를 사용하였다.

분리 및 동정

Listeria 속을 분리하기 위하여 Lovett 등[16]의 방법과 Weagant 등[33]의 방법을 변용하였다. 각 해산물을 25 g씩 취하여 멸균된 소량의 LEB를 넣어 균질기(homogenizer, Nihonseiki Co., Japan)로 2분간 처리하여 LEB를 가하여 최종량이 225 ml가 되게 하였다. 각 해수는 100 ml씩 여과(0.45 μ m membrane filter, Whatman)하여 멸균된 50 ml LEB가 들어있는 100 ml의 삼각플라스크에 넣어 이후의 실험을 실시하였다. 양성 대조구인 *L. monocytogenes* ATCC 19111는 0.6% TSB-YE배지에 접종시켜, 30°C에서 24시간 2회 계대 배양하여 균을 활성화시킨 후 검체와 동일한 배양 방법으로 활성화시킨 배양액 1 ml를 멸균된 LEB 9 ml에 가하여 30°C에서 1일~7일간 증균 배양하면서 Fig. 1과 같은 실험을 하였다.

β -Hemolysis test

1차 생화학 시험에서 *Listeria* 속으로 추정되는 균주에 대하여 상품화된 5% BAP상에서 β -Hemolysis 시험을 통해 β 용혈소 생성여부에 따라 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* 등을 구별하였다. *Listeria* 속으로 추정되는 균주를 0.6% TSA-YE 평판배지에 계대한 후 1백금이를 취하여 0.6% TSB-YE 9 ml에 접종한 후 30°C에서 6시간 배양 후 배양액을 5% BAP에 희석 도말하여 Sodokawa 등[28]과 같이 37°C에서 96시간 혐기배양한 후 *Listeria* 속의 용혈 유무를 관찰하였다.

CAMP test

β -Hemolysis 시험에서 β 용혈을 나타내고, 생화학 시험

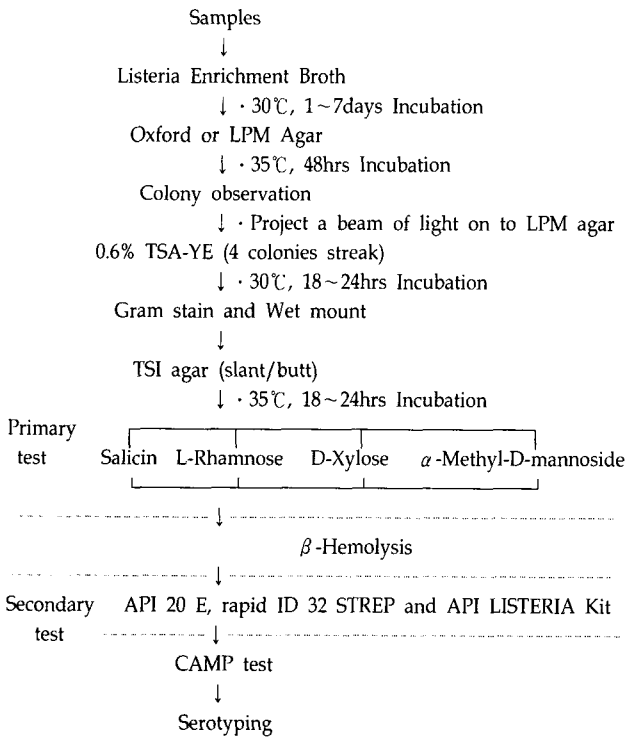


Fig. 1. Isolation Procedure of *Listeria* sp.

에서 *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*로 동정된 균주의 용혈 상승작용을 관찰하기 위하여 CAMP test를 실시하였다[27]. CAMP 시험용 배지로는 Tryptic Soy Agar (이하 TSA)와 Columbia Blood Agar base (이하 CBA, Difco Lab.)를 사용하였고, 지표균으로는 *S. aureus* ATCC 25923과 *R. equi* KCTC 9082를 사용하였다. 먼저 100 ml의 CBA를 이용하여 평판배지를 제조 건조시킨 후 46°C로 보온한 TSA에 7%가 되게 적혈구를 혼합하여 기초배지 위에 8 ml를 중층하여 CAMP 시험용 배지를 만들었다. 지표균인 *S. aureus* ATCC 25923과 *R. equi* KCTC 9082를 사용 1일 전에 계대하여 활성화시킨 후 β-Hemolysis 시험에서 용혈성을 나타낸 분리균주를 지표균에 대해 직각으로 거리 간격을 1~2 mm 떨어지게 각각 접종하여 35°C에서 24시간 배양하여 용혈상승작용을 관찰하였다.

혈청형 시험

*L. monocytogenes*로 밝혀진 분리균에 대하여 Lovett 등 [15]의 실험방법에 따라 0.6% TSA-YE배지 9 ml에 접종하여 35°C에서 5~6시간 배양하였다. 이후 0.6% TSA-YE평판 배지에 획선 도말하여 35°C에서 약 18~24시간 2회 계대배

양한 후 FA buffer(Difco Lab.) 3 ml가 든 screw 시험관(13 × 100 mm)에 현탁하여 80°C의 항온수조에서 1시간 처리한 후, 원심분리기에서 3,000 rpm으로 3분간 원심 분리시켜 2.2 ml의 원심여액을 제거하고 나머지 부분을 다시 현탁시켰다. Bacto *Listeria* O antiserum (Difco Lab.) Serotypes 1,4(Poly)와 Serotype 1과 Serotype 4를 멸균된 0.85% 생리 식염수로 각각 1 : 20으로 희석하였다. 균 현탁액을 슬라이드 글라스에 1방울씩 가하고 그 위에 상기 항혈청 1방울을 가해 응집여부에 따라 혈청형을 분류하였다.

분리 검출된 *Listeria* 속에 대한 상기이외의 각종 생리학적 생화학적 실험법은 Lovett 등[15,16,17]의 방법과 Sodo-kawa 등[28]의 방법에 따라 실시하였다.

결과 및 고찰

증균배양에 따른 *Listeria* 속의 검출율

총 100건의 해산물 또는 해수 검체에서 증균배양에 따른 *Listeria* 속의 검출율은 30°C에서 1일 증균배양에서 총 44주의 *Listeria* 속이 분리되었다. 이들 분리균주는 여러 실험결과로부터 Table 1과 같이 *L. monocytogenes*가 4%(4건), *L. innocua*가 35%(35건), *L. ivanovii*가 4%(4건), *L. welshimeri*가 1%(1건)로 나타났다. 그리고 상기와 동일한 방법으로 7일간 증균배양에서는 *L. monocytogenes*가 7%(7건), *L. innocua*가 38%(38건), *L. ivanovii*가 5%(5건), *L. welshimeri*가 1%(1건)로 총 51주가 분리되었다. 이들 결과로부터 1일간 증균배양과 비교하여 7일간 증균배양으로부터 *Listeria* 속의 분리에는 높은 검출율을 나타내었으며 특히 *L. innocua*가 검체 별로 35%(1일), 38%(7일)의 높은 분리율을 보였다.

한편, 손 등[29, 30]이 도계장 유래 닭고기와 부산물 및 환경재료에서 30°C 조건으로 LEB에 24시간 증균하여 3.9%

Table 1. Number of isolated *Listeria* sp. on enrichment cultivation from 100 samples

Cultivation time (day)	1	7
<i>L. monocytogenes</i>	4	7
<i>L. innocua</i>	35	38
<i>L. ivanovii</i>	4	5
<i>L. welshimeri</i>	1	1
Total Number	44	51

(12/307)의 분리율과, 그 균 배양액을 다시 LEB에 옮겨 24시간 증균하여 7.2%(22/307)의 검출율을 나타내었다. 그리고 4°C에서 1주일 증균했을 경우 분리를 위한 검출율은 9.8%(30/307)로 증가하여 본 실험과 같이 높은 검출율을 나타냈으며, Lovett 등[17]이 해산물에서 *Listeria* 속을 분리하기 위해 24시간 증균배양하는 것보다는 48시간 증균배양하는 것이 더 효과적이며, 7일 증균배양하는 것이 USDA-FSIS (U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service)방법[18]보다 더 효과적이었다는 보고와 같이 비록 7일 증균배양하는 것이 분리에는 많은 시간이 소요되나 *Listeria* 속의 분리에는 검출율이 높은 이점이 있다고 생각된다.

선택 배지에 따른 *Listeria* 속의 분리율

LEB에서 증균배양시킨 배양액을 Oxford와 LPM선택배지에 도말하여 *Listeria* 속을 분리한 결과는 Table 2와 같다. 100건의 검체에서 *Listeria* 속을 분리한 결과 Oxford 선택배지에서 1일 증균배양하였을 경우 *L. monocytogenes*가 5%(5건), *L. innocua*가 34%(34건), *L. ivanovii*가 4%(4건), *L. welshimeri*가 1%(1건)가 분리되었고, 7일 증균배양시 *L. monocytogenes*가 6%(6건), *L. innocua*가 37%(37건), *L. ivanovii*가 5%(5건), *L. welshimeri*가 1%(1건)가 분리되었다. LPM 선택배지에서는 1일 증균배양시 *L. monocytogenes*가 4%(4건), *L. innocua*가 31%(31건), *L. ivanovii*가 4%(4건), *L. welshimeri*가 1%(1건)가 분리되었고, 7일 증균배양시 *L. monocytogenes*가 5%(5건), *L. innocua*가 33%(33건), *L. ivanovii*가 4%(4건), *L. welshimeri*가 1%(1건)가 분리되었다.

Table 2. Isolated number of *Listeria* sp. on the two selective media from 100 samples

Medium*	Oxford		LPM	
	1	7	1	7
<i>L. monocytogenes</i>	5	6	4	5
<i>L. innocua</i>	34	37	31	33
<i>L. ivanovii</i>	4	5	4	4
<i>L. welshimeri</i>	1	1	1	1
Total No.	44	49	40	43

*Oxford and LPM means *Listeria* Selective Agar base and LiCl-Phenylethanol-Moxalactam Agar, respectively.

Oxford 선택배지에서 1일 증균시 *Listeria* 속이 44%(44건), LPM 선택배지에서는 40%(40건)가 분리되었고, 7일 증균배양에서는 Oxford 선택배지에서 *Listeria* 속이 49%(49건), LPM 선택배지에서는 43%(43건)가 분리되어 Oxford 선택배지를 이용하였을 경우 LPM 선택배지보다 *Listeria* 속의 검출율이 조금 높게 나타났다. 이것은 Oxford선택배지에서 *Listeria* 속이 Esculin을 이용하여 집락이 검은 바탕을 띄어 균을 식별하기가 LPM선택배지보다 용이하므로 효율적인 검출율을 나타낸 것으로 생각된다.

이 등[13]의 결과에 의하면 실제 검체량은 알 수 없으나 TSA평판배지에서 자라난 집락들을 옮겨 전체 균주로 하여 분리 동정한 결과 Oxford선택배지에서 102주와 LPM선택배지에서 99주의 *Listeria* 속이 분리된 예와 본 실험과 비슷한 결과임을 알 수 있었다. 그리고 위의 실험결과로부터 증균배양에서의 검출율이 선택배지에서 보다 약간의 우수성은 보이거나 대체적으로 유사한 결과를 보였다.

검체에 따른 *Listeria* 속의 분리율과 균종 별 분리율

검체에 따른 *Listeria* 속의 분리율은 Table 3에서 보는 바와 같이 총100건의 검체 중 *Listeria* 속은 51건으로 검체에 대하여 51%의 분리율을 보였다. 검체 별로 살펴보면 새우와 가재에서 80%(16/20)로 분리율이 가장 높았으며, 바지락에서 50%(10/20), 해수에서 25%(5/20), 홍합에서 20%(4/20)의 순으로 나타났다. 그리고 *Listeria* 속의 균종 별 분리율은 총 100건의 검체 중에서 *L. innocua*가 38%(38/100), *L. monocytogenes*가 7%(7/100), *L. ivanovii*가 5%(5/100), *L. welshimeri*가 1%(1/100)순으로 분리되었다. 이와 같은 결과는 Weagant 등[15]이 한국의 냉동 해산물 검체에서 *Listeria* 속을 72.2%(13/18), *L. innocua*를 55.6%(10/18), *L. monocytogenes*를 16.7%(3/18) 분리하였다고 한 보고와 Yatarō 등[26]이 Gilbert의 결과를 인용하여 생선과 어제품에서 37%(17/46)의 *L. monocytogenes*를 분리하였다는 보고와 비교할 때 낮은 분리율을 보였다.

각 검체에서 *Listeria* 속의 균종 별 분리율은 20건의 새우에서 *L. innocua*가 65%(13/20), *L. monocytogenes*가 15%(3/20), 20건의 가재에서 *L. innocua*가 70%(14/20), *L. monocytogenes*가 10%(2/20)의 비율로 분리되었다. 그리고 20건의 홍합 검체에서 *L. innocua*가 10%(2/20), *L. monocytogenes*가 5%(1/20), *L. welshimeri*가 5%(1/20)의 비율로 나타났으

Table 3. Isolation rates and numbers of *Listeria* sp. in various specimens collected from sea food and seawater

Specimens	Shrimps	Crayfishes	Mussels	Little neck clams	Seawater
No. of sample	20	20	20	20	20
<i>L. monocytogenes</i>	15%(3)	10%(2)	5%(1)	5%(1)	
<i>L. innocua</i>	65%(13)	70%(14)	10%(2)	45%(9)	
<i>L. ivanovii</i>					25%(5)
<i>L. welshimeri</i>			5%(1)		
Total isolates	80%(16)	80%(16)	20%(4)	50%(10)	25%(5)

며, 20건의 바지락에서는 *L. innocua*가 45%(9/20), *L. monocytogenes*가 5%(1/20)로, 20건의 해수에서는 *L. ivanovii*만이 25%(5/20)분리되었다. Farber[6]는 미국산 새우 검체에서 *L. monocytogenes*를 8.9%(4/45) 분리하였고, Motes[19]는 멕시코만 북부 19개 지역에서 새우로부터 *L. monocytogenes*를 10.8%(8/74) 분리하였고, 해수에서 *L. monocytogenes*를 3.8%(3/78), *L. innocua*를 1.3%(1/78)분리했다는 보고와 비교해 볼 때 본 실험에서 사용된 새우 검체는 조금 높은 분리율을 나타내었으며, 해수는 *Listeria* 속이 달라 비교할 수 없었다. 또한 검체에서 *L. innocua*가 많이 검출된 것은 손 등[29]이 도계장 유래 닭고기와 부산물 및 환경재료 307검체에서 *L. innocua*가 34건(11.1%), *L. monocytogenes*가 10건(3.3%) 검출된 것과 검체 수는 알 수 없으나 이 등[13]이 육류에서 *L. innocua*가 291건, *L. monocytogenes*가 166건 검출된 것과 Weagant 등[33]이 냉동 해산물 57건 중에서 *L. innocua*가 26건(45.6%), *L. monocytogenes*가 15건(26.3%) 검출된 결과와 비교해 볼 때 *Listeria* 속의 분리에서 *L. innocua*가 많이 검출되고 있음을 알 수 있었다.

분리된 *Listeria* 속의 생화학적 특성

해수와 해산물에서 분리된 *Listeria* 속의 API 20E, rapid ID 32 STREP 및 API LISTERIA kit를 이용하여 37℃에서 4시간과 35℃에서 18~24시간 배양하여 Automated Tests for Bacteriology System(bioMérieux sa, ATB Expression, France)를 통하여 밝혀진 생화학적 특징은 Table 4, 5에 나타내었다. 이와 함께 이들 분리균주들에 대하여 β-Hemolysis와 CAMP test에 대한 결과는 각각 Table 6과 Table 7에 나타내었다.

분리된 51주의 *Listeria* 속에 대하여 Catalase, motility, 그람염색, 당 이용성, β-Hemolysis와 CAMP test를 실시

Table 4. Biochemical characteristics of 7 *L. monocytogenes* isolated from seafood

Characteristics	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>L. monocytogenes</i> Isolates (7)
Catalase	+	+
Acid from Salicin	+	+
D-Xylose	-	-
L-Rhamnose	+	+
α-Methyl-D-mannoside	+	+
Esculin	+	+
Acid from D-arabitol	+	+
Ribose	-	-
D-Tagatose	-	-
Glucose-1-Phosphate	-	-
ONPG (β-galactosidase)	-	-
Hydrogen sulfide on TSI	-	-
Indole	-	-
Voges-Proskauer	+	+
Methyl red	+	+
Simmon's citrate	-	-
Gelatinase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-
Acid from Glucose	+	+
Mannitol	-	-
Sucrose	-	-
Inositol	-	-
Sorbitol	-	-
Arabinose	-	-
Lactose	+	+
Oxidase	-	-

+: Positive, -: Negative

해수와 해산물로부터 *Listeria* 속의 분리와 세균학적 조사

Table 5. Biochemical characteristics of *Listeria* sp. isolated from sea food and seawater

Characteristics	<i>L. innocua</i> (38)	<i>L. ivanovii</i> (5)	<i>L. welshimeri</i> (1)
Catalase	+	+	+
Acid from Salicin	+	+	+
D-Xylose	-	+	+
L-Rhamnose	+34/-4	-	+
α -Methyl-D-mannoside	+	-	+
Esculin	+	+	+
Acid from D-arabitol	+	+	+
Ribose	-	+	-
D-Tagatose	-	-	-
Glucose-1-Phosphate	-	-	+
ONPG (β -galactosidase)	-	-	-
Hydrogen sulfide on TSI	-	-	-
Indole	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+
Methyl red	+	+	+
Simmon's citrate	-	-	-
Gelatinase	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Acid from Glucose	+	+	+
Mannitol	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Lactose	+	+	+
Oxidase	-	-	-

+: Positive, -: Negative

Table 6. β -Hemolysis of *Listeria* sp. isolated from sea food and seawater

Strain or Characteristic	β -Hemolysis (Incubation hours)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	+ (24hrs)
D-Xylose(-)	
L-Rhamnose(+ or +/-)	+7/-38 (24hrs)
α -Methyl-D-mannoside(+)	
D-Xylose(+)	
L-Rhamnose(-)	++ 5 (24hrs)
α -Methyl-D-mannoside(-)	
D-Xylose(+)	
L-Rhamnose(+)	- 1 (96hrs)
α -Methyl-D-mannoside(+)	

Table 7. CAMP test for *Listeria* sp. isolated from sea food and seawater

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>R. equi</i> KCTC 9082
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	+(7)	+(7)
<i>L. ivanovii</i>	-(5)	+(5)

하였다. Catalase test는 과산화수소(3%) 함유 액체배지에서 가스발생 유무로, motility test는 soft agar배지 상에서 실시하였다. 결과로부터 전체 51균주가 Catalase, motility, 그람염색에서 양성을 나타내었으며, 이들 중에서 D-Xylose 음성, L-Rhamnose 양성, α -Methyl-D-mannoside양성이고

Table 6, 7의 결과로부터 β -Hemolysis 양성이며, CAMP test에서 *S. aureus*와 *R. equi*에 대하여 양성인 7주는 *L. monocytogenes*으로 판명되었다. D-xylose 음성, L-Rhamnose에 대하여 양성·음성(34+/4-), α -Methyl-D-mannoside에 양성을 나타내며 β -Hemolysis의 시험으로 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*의 구분이 가능한 38주에 대해서는 β -Hemolysis음성으로 최종적으로 *L. innocua*로 판단되었다(Table 5, 6, 7). 그리고 Table 6, 7의 결과로부터 β -Hemolysis에 강한 양성을 보이며, CAMP test에서 *S. aureus*에 대하여 음성이고 *R. equi*에 대하여 양성인 5주는 Table 5의 결과와 함께 판단할 때 *L. ivanovii*로 밝혀졌으며, β -Hemolysis 음성이며, D-Xylose 양성, L-Rhamnose 양성, α -Methyl-D-mannoside에 양성인 1주는 *L. welshimeri*로 96시간 배양 후에도 알려진 바와 같이[26] 용혈반응이 없었다.

이것은 이 등[13]과 손 등[29,30]이 육류와 도계장에서 분리한 *L. innocua*가 각각 90.4%와 84.9%의 L-Rhamnose 이 용성을 나타내는 것과 거의 동일함을 보였다. 이와 함께 Sodokawa 등[28]은 33주의 *L. monocytogenes*에 대해 β 용혈 시험을 하여 24시간 배양시 30주(30+/3-)의 용혈현상과 48시간 배양시 31주(31+/2-)의 용혈현상, 96시간 배양시 33주가 β 용혈을 띄었다고 했으나 본 시험에서 분리된 균주는 24시간만에 β 용혈을 나타내었으며 96시간배양에도 변화가 없었다(결과 미제시).

홍합에서 1건이 분리된 *L. welshimeri*는 Seeliger 등[26]의 결과에서는 L-Rhamnose에 대한 반응이 11~89%의 양성 반응을 나타낸다고 하였으나, 분리된 1건은 L-Rhamnose를 이용하므로 이 반응 율과는 비교할 수가 없었다.

양성 대조구로 사용한 *L. monocytogenes* ATCC 19111는 어느 정도 선명한 β -Hemolysis를 보였으나, *L. monocytogenes* Scott A 균주는 96시간 배양하였어도 용혈 현상을 거의 볼 수 없었다(결과 미제시). 이것은 수차례 분양되어 계대되는 동안 활력과 함께 변이가 일어난 것으로 생각된다.

분리된 *Listeria* 속의 CAMP test 결과

분리된 *Listeria* 속의 CAMP test 결과는 Table 7과 같으며 양성인 경우에는 지표균과의 교차 부분에 용혈환의 증상을 인정할 수 있었고, 대조용 균주로 사용한 *L. monocytogenes* ATCC 19111과 해산물에서 분리되어 β -Hemolysis 시험에서 양성을 보인 *L. monocytogenes* 7균주는 *S. aureus*

ATCC 25923과 *R. equi* KCTC 9082에 대하여 양성이었다. 이 실험에서 *S. aureus* ATCC 25923에 대한 용혈 폭의 넓이가 5mm 정도로 증강되어 있었고, *R. equi* KCTC 9082에 대하여는 화살촉 모양(Arrowhead zone)의 10~15mm 정도의 등근 투명한 용혈환을 보여 양성이었다. 이것은 Bergey's manual과 일본 후생성의 식품위생 검사지침서[9]와 Yasuji [35]가 *L. monocytogenes*는 *S. aureus*에 대해서만 양성이고, *R. equi*에 대하여는 음성이라는 결과와는 차이가 있었으며, Datta 등[4]은 10건의 *L. monocytogenes*를 CAMP test한 결과 9건이 *S. aureus*에 양성이었고, *R. equi*에 대하여는 음성이었으며, 1건만이 *S. aureus*와 *R. equi*에 대하여 양성인 것으로 보고하였다. 그러나 이 등[13]이 육류에서 분리한 *L. monocytogenes* 166주 전체에서 *S. aureus*와 *R. equi*에 대하여 양성인 것과 Smola[27]의 보고와 본 실험은 동일한 반응을 보였다. 그러므로 본 연구와 타 연구자와의 결과에서 상이점이 있으므로 향후 *L. monocytogenes*의 용혈성에 대하여 폭넓은 검토가 이루어져야 할 것이다. 해수에서 분리된 *L. ivanovii*는 *S. aureus*에 대하여 음성이었으나, *R. equi*에 대하여는 양성이었다.

분리된 *L. monocytogenes*의 혈청형 시험

각 검체에서 분리된 7주의 *L. monocytogenes*의 혈청형은 Bacto *Listeria* O antiserum Serotypes 1,4(Poly)와 Serotype 1과 Serotype 4를 이용하여 실시하였다. 얻어진 결과는 Table 8과 같으며, 7주 중 Type 1이 2주(28.6%)이었고, Type 4가 5주(71.4%)로 분류되었다. 검체 별로 살펴보면 새우에서 Type 1이 1주, Type 4가 2주이었고, 가재에서 Type 1이 1주, Type 4가 1주이었고, 바지락에서 type 4가 1주, 홍합

Table 8. Distribution of serotype in 7 strains of *L. monocytogenes* isolated from sea food

Source	No. of isolates	Serotype of isolates		
		Poly (1,4)	Type 1	Type 4
Shrimps	3	3		2
Clawfishs	2	2	1	1
Little neck clams	1	1	1	1
Hard-shelled mussels	1	1		1
Total	7	7(100%)	2(28.6%)	5(71.4%)

에서 Type 4가 1주로 분류되었다. 이것은 국내에서 강 등 [11]이 원유, 우유, 계육, 및 동물 분변에서 분리한 *L. monocytogenes* 5주 중 Type 1이 3주(60%), Type 4가 1주(20%), 비분류 주가 1주(20%)로 보고한 것과는 비슷한 혈청형을 나타냈으나, 손 등[30]이 도계장에서 분리한 *L. monocytogenes* 28주 중 Type 4가 12주(42.9%), 비분류 주가 16주(57.1%)로 보고한 것과는 차이가 있었다.

정 등[2,3]은 S.L.E 환자와 뇌척수액에서 분리한 *L. monocytogenes* 3주 중 혈청형은 4b와 1b, 4b이었고, 이 등 [13]이 육류에서 분리한 *L. monocytogenes* 166주 중 혈청형의 75% 이상이 1과 4b에 속한다고 한 것과 본 실험과는 정확한 serovars를 알 수 없기에 비교할 수가 없었다. Listeriosis를 유발할 수 있는 serovars는 1, 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4, 4b, 4c, 4d, 4e 등으로 보고되어 있으나[6,7] 특히, listeriosis환자에서 많이 분리되는 혈청형은 1/2a와 1/2b, 4b이며, 이것은 90% 이상을 차지한다고 보고되어 있다[7,8]. 그러므로, 본 실험에서 분리된 *L. monocytogenes*의 혈청형이 1과 4로 분류되었기에 위의 serovars에 속한다고 추측되며 Walter 등[32]이 혈청형 1과 4가 사람에게 치명적인 균주라고 보고했으나 본 실험에서 분리된 *L. monocytogenes*의 listeriosis 유발 가능성에 대해서는 추후의 구체적인 *in vivo* 실험 등이 필요하다.

요 약

본 연구는 경남지역의 해수와 해산물에서 *Listeria* 속을 분리하여 증균배양방법에 따른 균의 분리율, 선택배지에 따른 균의 분리율, 검체에 따른 균종 별 분리율, 생화학 시험과 분리된 *L. monocytogenes*에 대하여는 혈청형 시험을 실시하였다. 총 100건의 검체에서 증균배양에 따른 *Listeria* 속의 분리율은 1일 증균배양에서 *L. monocytogenes*가 4% (4건), *L. innocua*가 35%(35건), *L. ivanovii*가 4%(4건), *L. welshimeri*가 1%(1건)였고, 7일간 증균배양에서는 *L. monocytogenes*가 7%(7건), *L. innocua*가 38%(38건), *L. ivanovii*가 5%(5건), *L. welshimeri*가 1%(1건)로 동정되어 1일 증균배양보다 7일간의 증균배양이 *Listeria* 속의 분리에 훨씬 효과적이었다. 이와 함께 Oxford 선택배지나 LPM 선택배지를 사용하였을 경우 증균배양과 비교하여 검출율이 조금 낮았다. 검체에 따른 *Listeria* 속의 분리율은 새우와 가재에서

80%(16/20)로 분리율이 가장 높았으며, 바지락에서 50% (10/20), 해수에서 25%(5/20), 홍합에서 20%(4/20)의 순으로 나타났다. 그리고 *Listeria* 속의 균종 별 분리율은 *L. innocua*가 38%(38건), *L. monocytogenes*가 7%(7건), *L. ivanovii*가 5%(5건), *L. welshimeri*가 1%(1건)순으로 분리되었다. 각 검체에서 *Listeria* 속의 균종 별 분리율은 새우에서 *L. innocua*가 65%(13건), *L. monocytogenes*가 15%(3건), 가재에서 *L. innocua*가 70%(14건), *L. monocytogenes*가 10%(2건), 바지락에서 *L. innocua*가 45%(9건), *L. monocytogenes*가 5%(1건), 홍합에서 *L. innocua*가 10%(2건), *L. monocytogenes*가 5%(1건), *L. welshimeri*가 5%(1건), 해수에서 *L. ivanovii*가 25%(5건) 분리되었다. *L. monocytogenes*로 분리 동정된 7주에 대한 혈청형 분류는 type I이 2주, type IV가 5주로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2002학년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Brackett, R. E. 1988. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technology*. April, 162-164.
2. Chong, Y. S., H. S. Kim and S. Y. Lee. 1973. Bacteriological characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from the blood of an S.L.E patient. *J. Kor. Soc. Microbiol.* 8, 27-32.
3. Chong, Y. S., Y. C. Kim, B. S. Kim, K.N. Yi and S. Y. Lee. 1978. Two case of *Listeria monocytogenes* isolation from cerebrospinal fluid. *J. Kor. Soc. Microbiol.* 13, 1-5.
4. Datta, A. R., W. A. Barry and H. E. Water. 1988. Identification and enumeration of beta-haemolytic *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 673-675.
5. Elmer H. M. 1988. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*. April, 165-168.
6. Farber, J. M. 1991. *Listeria monocytogenes* in fish products. *J. Food. Protec.* 54, 922-924, 934.
7. Farber, J. M. and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*

- 55, 476-481.
8. Gellin, B. G. and C. V. Broome. 1982. Listeriosis. *J. Am. Med. Assoc.* **261**, 1313-1320.
 9. Japan Food Hygiene association 1990. Standard methods of analysis in food safety regulation, biology. chapter 1. bacteria 9. Listeria. pp.168-177, Tokyo.
 10. JungAngllbo, 1993. 3. 31. pp.23
 11. Kang, H. J., W. G. Son, G. S. Kang and C. E. Park. 1991. Characteristics of isolates and incidence of *Listeria monocytogenes* in faeces from animals, feeds and raw foods of animal origin. 1. incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk, beef, chicken meat and animal faeces. *Kor. J. Publ. Hith.* **15**, 231-237.
 12. KyungNamShinMun, 1993. 3. 9.
 13. Lee, Y. W., B. S. Kim, K. H. Kim, Y. S. Lee, Y. J. Park, M. R. Tung and W. S. Han. 1992. Bacteriological study of *Listeria* spp. isolated in Korea. *The report of NIH* **29**, 49-57.
 14. Lennon. D., B. Lewis, C. Mantell, D. Becroft, B. Dove, K. Farmer, S. Tonkin, S. Yeates, R. Stamp and K. Mickleson. 1984. Epidemic perinatal listeriosis. *pediatr. Infect. Dis.* **3**, 30-34.
 15. Lovett, J. D., W. Francis and J. M. Hunt. 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk : detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Prot.* **50**, 188-192.
 16. Lovett, J. D. 1988. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 658-660.
 17. Lovett, J., D. W. Francis, J. T. Peeler and R. M. Twedt. 1991. Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from seafoods. *J. Food Prot.* **54**, 7-11.
 18. Mclin, D. and H. Lee. 1988. Development of USDA-FSIS method for isolation of *L. monocytogenes* from raw meat and poultry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**(3), 660-664
 19. Motes, M. L. 1991. Incidence of *Listeria* spp. in shrimp, oysters, and estaurine waters. *J. Food Prot.* **54**, 170-173.
 20. Murray, E. G. D., R. A. Webb and M. B. R. Swann. 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear lueocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.* **29**, 407-439.
 21. Pirie, J. H. H. 1927. *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.* **3**: 163. Pirie., J. H. H. 1940. *Listeria* : Change of name for a genus of bacteria. *Nature* **145**, 264.
 22. Robert M. P. 1982. 29 Miscellaneous pathogenic bacteria-*Listeria*, pp. 278-280. *Medical Microbiology*. Addison-Wesley, California.
 23. Rocourt, J., F. Grimont, P. A. D. Grimont and H. P. R. Seeliger. 1982. DNA relatednes among serovars of *Listeria monocytogenes* sen su lato. *curr. Microbiol.* **7**, 383-388.
 24. Rocourt, J., U. Wehmeyer and E. Stackebrandt. 1987. Transfer of *Listeria denitrificans* of a new genus, *Jonesia* gennov, as *Jonesia denitrificans* comb nov. *Int. J. System Bacteriol.* **30**, 266.
 25. Seeliger, H. P. R. 1984. Modern taxonomy of the *Listeria* group-relationship to its pathogenicity. *Clin. Invest. Med.* **7**, 217-221.
 26. Seeliger. H. P. R. and D. Jones. 1986. Genus *Listeria*, pp. 1235-1245. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
 27. Smola, J. 1989. Possibilities of differentiation of listerial hemolysins by synergistic hemolytic reactions (CAMP reaction). *Int. J. Food Microbiol.* **8**, 265-267.
 28. Sodokawa, K., H. Koga and M. Iwashita. 1990. Biological characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food and Hygiene Research* **40**, 33-41.
 29. Son, W. G. and H. J. Kang. 1991. Characteristics and isolation of *Listeria* spp. from poultry meat, products and environmental specimens in chicken slaughterhouse. I. Isolation of *Listeria* sp.. *Kor. J. Vet. Res.* **31**, 271-277.
 30. Son, W. G. and H. J. Kang. 1991. Characteristics and isolation of *Listeria* spp. from poultry meat, products and environmental specimens in chicken slaughterhouse II. Serotype and antimicrobial susceptibilities of *L. monocytogenes*. *Kor. J. Vet. Res.* **31**, 279-284.
 31. Susan, A. M. 1992. Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and Resistance to Biocides. *Food Technology*. **December**, 84-87.
 32. Walter F. S. 1988. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology* **April**, 176-178.
 33. Weagant, S. D., P. N. Sado, K. G. Colburn, J. D. Torkelson, F. A. Stanley, M. H. Krane, S. C. Shields and C. F. Thayer. 1988. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Prot.* **51**, 655-657.
 34. Wilson, G. S. and A. A. Miles. 1946. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*. pp. 395-401, 3rd eds., The Williams & Wilkins Company,

Baltimore.

35. Yasuji, K. 1988. Listeriosis as foodborne zoonosis. *Modernmedia infection* **34**. 477-485.

36. Yatarō, K. and I. Takashi. 1991. Record of the international conference on “*Listeria* and food safety. *Modernmedia infection*. **37**, 543-550.

(Received February 28, 2003; Accepted July 28, 2003)